第 19 卷 第 4 期　　昆 虫 学 报　　Vol. 19, No. 4
1976 年 11 月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　November, 1976

马尾松毛虫性引诱外激素活性组分的柱层析分离*

中国科学院北京动物研究所昆虫外激素组
江西省森林病虫害防治试验站昆虫组
中国科学院吉林应用化学研究所松毛虫外激素组

摘要　通过低温沉淀，去除马尾松毛虫性外激素粗提油的非活性杂质，将所得的活性上清油分别用葡聚糖凝胶柱和硅胶柱进行柱层析。用触角电位 (EAG) 技术和林间生物测定方法鉴定柱层析馏份的活性，同时对这些馏份进行了硅胶薄层层析分析。实验结果表明，马尾松毛虫性外激素系统可能是多组分的，最少包括两种成份，其一极性较强，另一则较弱。前者可能具有醇的功能团，因为粗提油皂化后，无论是 EAG 检测或是林间生物测定都证明具有活性。

马尾松毛虫 (*Dendrolimus punctatus* Walker) 是为害马尾松的一种主要害虫，分布于我国中南、华东和西南各省，每年发生三或四代。和多数昆虫一样，在交尾活动中，性外激素通讯系统在马尾松毛虫两性之间起着相互联系的作用。如置未经交尾的雌蛾或其腹尖粗提物于诱捕器中，便可诱来雄蛾。实验证明，雌蛾接受雄蛾交尾之前，往往先行释放性外激素，通过气流，为雄蛾的触角所感受，激起性兴奋，使之定向飞行，接近雌蛾（北京动物所，1973；湖南林科所等，1975）。

在预报及防治的实际应用上，要求有足量人工合成的马尾松毛虫性外激素。因此我们对这种天然的外激素进行了分离，为进一步纯化和鉴定结构创造条件，以期达到人工合成的目的。在本文中将着重说明马尾松毛虫性外激素柱层析的分离问题，并就其活性组分的性质作初步的探讨。

马尾松毛虫性外激素的分离方法

低温沉淀分离　以二氯甲烷为溶剂提取松毛虫腹尖所得的性外激素粗提油（北京动物所，1973）含有大量分子量高的或其他脂类杂质。在柱层析分离前，以低温沉淀的方法去除这些杂质（Jones 等，1966；Kuwahara 等，1971）用丙酮（粗提油体积的 20 倍）溶解粗提油，在低温下（−50° 至 −70℃）放置 24 小时，把沉淀滤出，并以冷却的丙酮洗涤，然后将沉淀洗涤液与过滤液合并。再用 10 倍体积的丙酮溶解沉淀，进行第二次低温处理 12 小时。最后把第二次的沉淀洗涤液和过滤液与第一次的合并。在室温常压下待溶剂蒸发后即得性外激素上清油。

葡聚糖凝胶渗透柱层析分离　取上清油 1.2 毫升（1,000 头雌蛾当量）溶于 5 毫升洗

* 在此项工作中得到江西省弋阳、乐平、万年和余江县林业局，安徽省嘉山县农业局、沙庄林场和西桃园林场以及广东省东莞县樟木头林场等兄弟单位的大力支持。

脱液(苯:甲醇 = 1:1),然后在葡聚糖凝胶柱 (Sephadex LH-20,1.9 × 40 厘米)上样。用 200 毫升洗脱液洗脱,以洗脱速度 18 毫升/小时进行部分收集,每一馏份为 5 毫升,共收集 40 馏份。

硅胶柱层析分离　以等体积的石油醚 (60—70℃) 稀释 1.8 毫升上清油 (1,500 头雌蛾当量),在 1.9 × 35 厘米的硅胶柱 (120 目,110℃ 活化 5 小时) 上样。先后按顺序用含有 5%、7.5%、15%、30%、50% 乙醚的石油醚混合液以及乙醚 200 毫升进行展层。展层液流速为 2 毫升/分,连续按 50 毫升为一馏份进行部分收集。

低温沉淀分离与柱层析分离的样品都经过硅胶G薄层层析分析。薄层厚 0.5 毫米,展层液由石油醚 (60—70℃): 乙醚:乙酸 (按体积 85:15:1) 组成。展层后用硫酸碳化显色。

性引诱生物活性的测定方法

触角电位检测　关于触角电位检测方法我们另作了详细报道(北京动物所等,1976),与 Roelofs & Comeau 的基本相似 (Roelofs 等, 1971)。作为记录电极是一根 (1 × 30 毫米) 充满昆虫生理溶液的玻璃毛细管。一端通过钨丝接连直流放大器的输入端,另一端与剪掉一、二节的雄蛾触角远端相接。在接地的无关钨丝电极上覆盖一小块吸有生理溶液的棉花球。将带有部分头部组织的离体触角紧压在棉花球上,并用昆虫针固定于蜡盘,使触角近端与无关电极有良好的接触。

借助注射器使一小股气流 (2 毫升) 迅速吹过 1 片 (1 × 2 厘米)滴有柱层析样品 (20 或 100 头雌蛾当量) 的滤纸,随即进入吹向触角的气流,其流速为 200 毫升/分。触角电位变化经过放大显示在阴极示波器的萤光屏上。电位反应的振幅 (毫伏) 可直接在萤光屏上测量,或照相记录下来(图1)。此外,我们在检测过程中还选用了一个固定的而又能恒定地诱发触角电位反应的样品 (葡聚糖凝胶柱层析第十二馏份)来监测触角的反应能力。

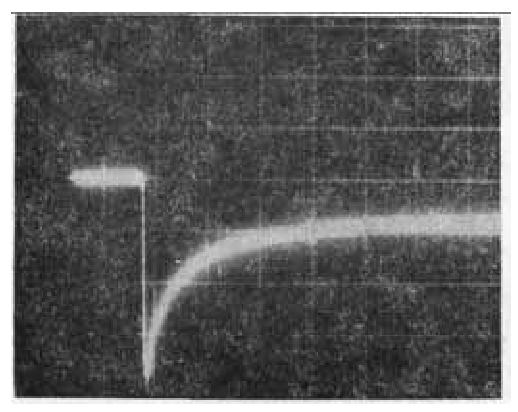


图 1　松毛虫雄蛾的触角电位反应
(1 横格 = 0.5 秒, 1纵格 = 1 毫伏)

林间生物测定　样品的性引诱生物活性的林间生物测定方法和以前我们使用的相同 (北京动物所, 1973)。我们采用圆筒型 (8 × 20 厘米) 具有漏斗形进蛾单孔的诱捕器。将低温沉淀的和柱层析分离的试样定量滴在小纸卷上,装入诱捕器中。诱捕器一般挂在松树树冠下距地面至少 1.5 米以上。每日检查一次诱捕雄蛾头数。不装有性引诱活性物质的对照诱捕器一般不会诱到雄蛾。多次试验表明,这种圆筒型诱捕器的诱蛾效率虽不理想,但具有相当高的诱蛾特异性。

结果分析与讨论

从粗提油经过低温沉淀分离出来的上清油和沉淀物的诱蛾活性,是在江西省弋阳县 1973 年 5 月测试的,而上清油柱层析分离的不同馏份则是在江西省乐平县和安徽省嘉山

县两地同时于1975年9月进行林间生物测定的。

通过林间生物测定，我们检查了马尾松毛虫性外激素粗提油低温沉淀的分离效果(表1)。在这次试验中共使用了152个诱捕器。其中30个作为对照,其余分为3组，分别装进滴有20头雌蛾当量的粗提油、上清油和沉淀物的小纸卷。在林间成虫羽化盛期检查各组诱捕器的诱蛾效果五天。试验结果表明，粗提油在低温下生成的沉淀物只带有极弱的活性，50个装有沉淀物的诱捕器在5天内只诱进8头雄蛾。活性组分主要集中于上清油,无论从诱捕雄蛾总数或诱捕量和诱捕率来看，上清油比沉淀物都要高得多，与粗提油相比,则无明显的差异。

表1　马尾松毛虫性引诱粗提油低温沉淀后诱蛾活性的分布

	粗提油	上清油	沉淀物	对照
诱捕器总数	22	50	50	30
观察天数	5	5	5	5
诱进雄蛾总数	79	141	8	0
诱捕量(头/诱捕器/日)	1.3—2.9	1.5—2.4	1.0—1.4	0
诱捕率(%)	18—64	22—48	0—10	0

就性引诱活性而言,低温沉淀分离虽不完全，但方法简便易行，又能去除大量非活性的杂质。因此,我们认为通过低温沉淀分离有利于减轻层析柱的负担,而同时又达到一定分离的目的。

葡聚糖凝胶柱层析11—18馏份的诱蛾活性都经过林间生物测定。测试时将每一馏份按100头雌蛾当量/诱捕器分装到30个诱捕器中,所得的试验结果列于表2。上清油经过葡聚糖凝胶柱层析后,具有诱蛾活性的组分分布于11—15馏份,主要集中在第55—70毫升的洗脱液中，共15毫升。图2表示柱层析不同馏份对雄蛾触角引起电位反应的振幅。13和14两馏份的林间诱蛾活性最高,激起触角电位反应也最大,分别为4.0和4.2毫伏。

表2　葡聚糖凝胶柱层析馏份的林间诱蛾活性

馏份	洗脱液毫升数	诱捕雄蛾总头数
11	50—55	23
12	55—60	65
13	60—65	68
14	65—70	52
15	70—75	22
16	75—80	7
17	80—85	1
18	85—90	2

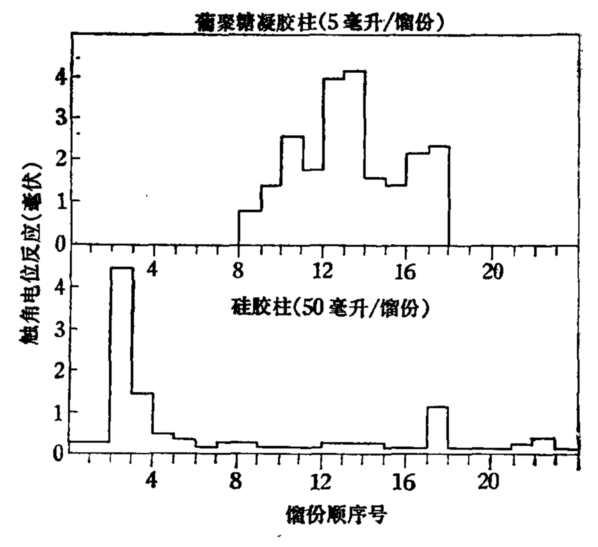


图2　松毛虫雄蛾触角对葡聚糖凝胶柱和硅胶柱层析不同馏份的触角电位反应

从12馏份的情况来看，它具有相当高的林间诱蛾活性，但仅能诱发振幅为1.8毫伏的触角电位。17和18馏份却不同，虽然它们激起的触角电位反应分别达到2.2和2.4毫伏，然而它们的林间诱蛾活性却极低(表2)。可以看出，能够引起触角电位反应的馏份并不一定具有诱蛾活性。因此在分离过程中不应轻易放弃象17和18这样的馏份。目前已有许多研究工作证明不少鳞翅目昆虫性引诱外激素系统是由多组分组成(Brady 等，1971; Meijer 等，1972)，有些组分单独存在时并无诱蛾活性，但却能激起触角电位反应。17和18两馏份是否由于含有的成分还不完备，不足以构成具有诱蛾效果的外激素系统，这是应该指出的问题。

上清油经硅胶柱层析分离，收集为24个馏份。根据这些馏份在硅胶G薄层层析的色谱图中的主要斑点和收集的顺序，合并为五个组合。组成这些组合的馏份及其林间诱蛾活性列在表3。每一组合按100头雌蛾当量分装到40个诱捕器，用以测定它们的林间诱蛾活性。测定的结果表明，性引诱活性成分相当集中分布于3—6馏份。其余四个组合的活性都很弱(表3)。3—6馏份不仅诱到雄蛾最多，而且分别在江西省乐平县和安徽省嘉山县两地同时测定的诱捕量和诱捕率都是很高的，诱捕量为4.8和3.8头雄蛾/诱捕器/日，诱捕率为50%和30%。

表3 硅胶柱层析馏份的林间诱蛾活性

组	馏 份	展层液中乙醚含量(%)	诱捕雄蛾总头数
I	1—2	5	2
II	3—6	5—7.5	178
III	7—13	7.5—30	1
IV	14—18	30—50	3
V	19—24	50—100	2

为了进一步分析硅胶柱层析的分离效果，我们还比较了每一馏份对触角激起电位反应的大小(图1)。雄蛾触角对3馏份的电位反应最大(4.2毫伏)，对4和18馏份也有反应，分别为1.5和1.2毫伏。3和4馏份都是由5%乙醚——石油醚洗脱下来的，其中含有的成分应该是极性弱的；18馏份是由50%乙醚——石油醚洗脱下来的，其中的成分应该是极性较强的，与前者显然是不相同的。此外，我们在气相色谱仪上制备的不同馏份中，发现有两个保留时间相差很大的而又

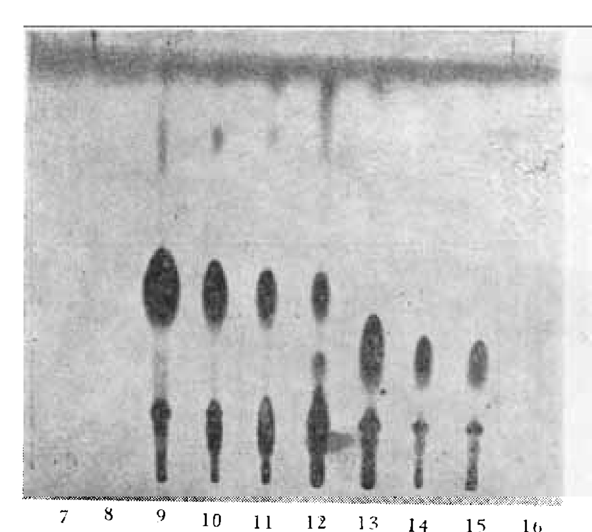


图3 上清油的葡聚糖凝胶柱层析馏份的硅胶G薄层层析色谱图，图中数字系层析馏份的顺序号

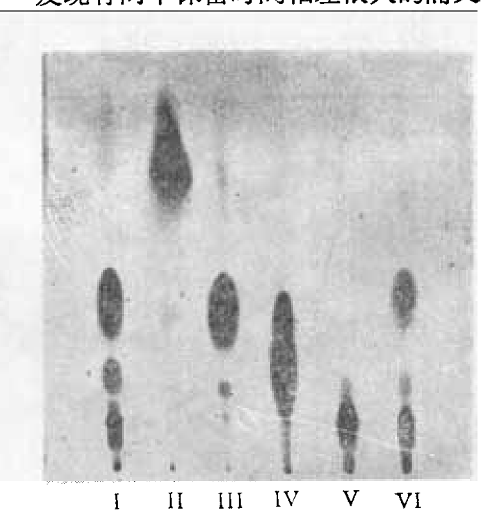


图4 上清油的硅胶柱层析馏份组合的硅胶G薄层层析色谱图

能激起触角电位反应的馏份。以上的事实似表明了松毛虫性外激素通讯系统可能是由两种或两种以上的组分构成的。

从薄层层析色谱图来看（图 3 和图 4），无论是凝胶柱层析或是硅胶柱层析的活性馏份或其组合，都含有一些复杂的成分。如众所周知，在凝胶层析过程中，按分子量大小不同的成分先后从层析柱洗脱下来。这样的馏份在薄层层析色谱图中常显出一系列 Rf 值不同的斑点。通过硅胶层析柱分离出来的组分，应该是按极性的强度先后洗脱下来。但实际上由于种种原因还存在分离不完全的现象。尤其是当馏份合并，在薄层色谱图上仍可看到极性相差相当大的斑点或痕迹（图 4 VI）。因此，通过以上的分离方法还难以判断性引诱活性成分的化学性质。

将皂化粗提油通过硅胶层析柱分离出含醇类的馏份。触角电位检测表明这种含醇的馏份能激起触角电位反应（2.5 毫伏）。我们曾把这样的馏份按 100 头雌蛾当量分装到 15 个诱捕器，在一日内诱到 14 头雄蛾，诱捕量和诱捕率分别为 2.8 头雄蛾/诱捕器/日和 33%。并且林间生物测定证明松毛虫性引诱粗提油经过皂化或酯化以后仍有一定的诱蛾活性。从这些结果来看，松毛虫性外激素系统包括醇类和酯类化合物的可能性是存在的。我们正在进一步把化学反应的方法紧密结合触角电位检测和林间生物测定来确定松毛虫性引诱活性组分的功能基团。

基于以上的事实，考虑到松毛虫性引诱外激素的活性组分可能有属醇类的。因此采用极性略强的溶剂，提高醇类组分的提取效率（Beroza，1975），取得组分更加完全的粗提油，是值得加以注意的。通过低温沉淀和葡聚糖凝胶层析去除大量分子量高的以及其他脂类杂质，进而通过硅胶层析按极性进行分离（Persoons 等，1974），我们认为这样的分离途径也适用于松毛虫性外激素。当然，通过化学反应方法，取得较多组分较单一的样品，便于进一步分离纯化，这也是值得试验使用的分离途径（Bierl 等，1974）。

参　考　资　料

中国科学院北京动物研究所昆虫外激素组　1973　马尾松毛虫成虫性引诱的初步观察。昆虫学报 **16** (1): 94—6。

中国科学院北京动物研究所昆虫外激素组、江西省森林病虫害防治试验站昆虫组　1976　触角电位及其测试方法。昆虫知识(待发表)。

湖南省林业科学研究所、广东农林学院林学系、湖南衡阳地区林业科学研究所　1975　马尾松毛虫性外激素的初步研究。昆虫学报 **18** (4): 385—92。

Beroza, M. 1975 Microanalytical methodology relating to the identification of insect sex pheromones and related behavior-control chemicals. *J. Chromat. Sci.* **13**:314—21.

Bierl, B. A., M. Beroza, R. T. Staten, P. E. Sonnet & V. E. Adler, 1974 The pink bollworm sex attractant. *J. Econ. Entomol.* **67**:211—6.

Brady, V. E., J. H. Tumlinson, R. G. Brownlee & R. M. Silverstein 1971 Sex stimulant and attractant in the Indian meal moth and in the almond moth. *Science* **171**:802—4.

Jones, W. A., M. Jacobson, & D. F. Martin 1966 Sex attractant of the pink bollworm moth: isolation, identification, and synthesis. *Science* **152**:1516—7.

Kuwahara, T., C. Kitamura, S. Takahashi, H. Hara, S. Ishi, & H. Fukami 1971 Sex pheromone of the almond moth and the Indian meal moth: cis-9, trans-12-tetradecadienyl acetate. *Science* **171**:801—2.

Meijer, G. M., F. J. Ritter, C. J. Persoons, A. K. Minks, & S. Voerman 1972 Sex pheromones of summer fruit tortrix moth *Adoxophyes orana*:two synergistic isomers. *Science* **175**: 1469—70.

Persoons, C. J., A. K. Minks, S. Voerman, W. L. Roelofs & F. J. Ritter 1974 Sex phero-

mones of the moth, *Archips podana*: isolation, identification and field evaluation of two synergistic geometrical isomers. *J. Insect Physiol.* **20**:1181—8.

Roelofs, W. L. & A. Comeau 1971 Sex Pheromone perception: electroantennogram responses of the redbanded leaf roller moth. *J. Insect Physiol.* **17**:1969—82.

PRELIMINARY ISOLATION OF SEX PHEROMONE OF THE PINE CATERPILLAR MOTH BY COLUMN CHROMATOGRAPHY

SECTION OF INSECT PHEROMONE, PEKING INSTITUTE OF ZOOLOGY, ACADEMIA SINICA

SECTION OF ENTOMOLOGY, FOREST PEST CONTROL EXPERIMENTAL STATION OF KIANGSI

SECTION OF PINE CATERPILLAR MOTH PHEROMONE, KIRIN INSTITUTE OF APPLIED CHEMISTRY, ACADEMIA SINICA

Low temperature precipitation from acetone solution was used to remove the extraneous inactive material from the crude extract of female abdominal tips of the pine caterpillar moth. After removal of the inactive precipitate, the active oil was chromatographed separately through Sephadex LH-20 and silica gel columns. The active fractions were identified by both EAG technique and field test, and resolved by thin layer chromatography. Experimental results show that the sex pheromone system of the pine caterpillar moth seems to have at least 2 components, one of which being more polar and the other less polar. The former probably has an alcohol functionality, for the saponified crude extract has been proved to be active in EAG responses as well as in field tests.